

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460508

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎と耐糖能異常におけるマクロファージの役割

研究課題名(英文)Role of the macrophages in non-alcoholic steatohepatitis and impaired glucose tolerance

研究代表者

中島 弘幸(Nakashima, Hiroyuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・助教)

研究者番号：10574064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肝臓のマクロファージ(Kupffer細胞)は、炎症性サイトカインを分泌するCD11b陽性分画と細菌の貪食を担うCD68陽性分画がある。前者は、肝障害モデルにおいて肝細胞を傷害する因子として機能する一方、肝再生モデルでは肝細胞の増殖を促進する機能を持つことを報告した。また、非アルコール性脂肪性肝炎の病態において慢性的な肝細胞障害をきたす因子としても機能することを見出した。その一方で、後者は、糖代謝に関連するPPAR-、コレステロール代謝に関連するLXRを発現しており、代謝そのものに直接機能している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Mouse liver Kupffer cells are classified into two subsets, recruiting CD11b(+) cells with potent cytokine producing capacity and resident CD68(+) cells with strong phagocytic activity. The former population induces hepatocyte apoptosis in experimental hepatitis models. On the contrary, these cells accelerate hepatocyte regeneration after partial hepatectomy. In Non-Alcoholic Steatohepatitis model, this cell population is strongly activated and induces chronic hepatocyte injury which in turn induces hepatic fibrosis and cirrhosis. On the other hand, the latter population expresses PPAR- and LXR which are indispensable in glucose and cholesterol metabolism. This result suggests the cell population exerts significant role in energy metabolism.

研究分野：免疫学

キーワード：Kupffer cells

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは免疫細胞の中でも極めて多彩な機能を有している。各臓器の中でも肝臓には Kupffer 細胞と呼ばれるマクロファージが多量に存在している。門脈を介して流入してくる異物の排除に機能する一方で、炎症性サイトカインを分泌することで、肝機能障害の発症においても中心的役割を果たしている。これまでの検討により肝 Kupffer 細胞には CD68 陽性の分画と、CD11b 陽性の分画があることが明らかになっている。前者は旺盛な貪食能をもち、後者は炎症性サイトカインを分泌する機能を有している。いままで単一の Kupffer 細胞が実施していたと考えられていた機能を分担しているのである。この二つの分画に着目することで肝 Kupffer 細胞の機能を詳細に明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

- (1) 両者 Kupffer 細胞の機能をより詳細に検討する。
- (2) 肝障害モデル、肝再生モデルにおいて両者の Kupffer 細胞がどのように関与するか検討する。
- (3) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における Kupffer 細胞の機能を検討する。

3. 研究の方法

主として C57BL/6 マウスを用いて以下の項目について検討を行った。

(1) Kupffer 細胞の包括的分類

放射線、Clodronate liposome (c-lipo) に対する感受性を検討する

各分画を消去したうえで細菌または腫瘍細胞を投与し、生存率を検証する。

(2) 実験モデルでの Kupffer 細胞の機能

四塩化炭素 (CCl₄) によって誘導される急性肝障害モデルにおいて各分画を検討する。

肝切除後の Kupffer 細胞の機能を検証する

(3) NASH における Kupffer 細胞の機能

Fibroblast growth factor 5 (FGF 5) 欠損マウスに高脂肪食を摂取させることで NASH を誘導し、各 Kupffer 細胞の分画と機能を検証する。

4. 研究成果

(1) Kupffer 細胞の包括的分類

かつて報告したように CD68 陽性の分画は肝臓をコラゲナーゼにより消化しなければ分離することは出来ない。コラゲナーゼ消化によって分離した肝単核球には CD68 陽性分画と類似しながらも、CD68 が陰性である細胞がある一定の割合で含まれていた。大きさや機能から同一の細胞群と考えられていた

が、明確なマーカーを欠いており、詳細は明らかになっていなかった。今回の検討でそのほとんどが CD32 陽性であることが明らかになり、より詳細な分類が可能となった。そしてこの細胞群の中には造血幹細胞のマーカーである c-kit が陽性の細胞群が含まれていた。CD68 抗原が陽性となるに従い c-kit は陰性となり、貪食能も旺盛となることを考慮すると、CD68 陽性分画は c-kit 陽性細胞から肝臓独自に分化してくることが示唆された。

組織マクロファージのマーカーである CR1g 遺伝子は CD68 陽性細胞に陽性となり、CD11b 陽性の分画は陰性であった。近年、Fate mapping study を用いた検討により、肝臓の Kupffer 細胞は組織マクロファージに分類され、肝臓で独自に分化すると報告されているが、今回のデータを裏付けると考えられる。

CD11b 陽性の分画は放射線に感受性があり、6G 照射によってほぼ完全に消失した。逆に CD68 陽性細胞は放射線抵抗性であり全く消失しなかった。逆に c-lipo は CD68 陽性細胞を除去したが、CD11b 陽性の分画はむしろ増加および活性化することを明らかにした。

c-lipo の投与は細菌の経静脈投与に対する生存率を著しく減少させたが、腫瘍細胞の投与については生存率を上昇させた。CD68 陽性細胞は貪食と殺菌を担い、CD11b 陽性細胞は抗腫瘍免疫に大きな役割を演じると考えられた。

以上の内容は欧文誌に掲載された (Ikarashi and Nakashima, Journal of Leukocyte Biology, 2013, p1325-36)。

さらにこの二つの分画において、脂質や糖代謝の関連遺伝子の発現を検討した。耐糖能異常に関与する PPAR- と、コレステロール代謝に関与する LXR は、CD68 陽性の分画において強く発現されていた。GdCl₃ を用いて Kupffer 細胞を消去することにより耐糖能異常が改善するという報告もある。肝臓が最大の代謝臓器であることは疑いようがないが、栄養代謝に関わるのは肝細胞だけではなく、類洞に固着して血液と直に接している CD68 陽性の Kupffer 細胞も少なからず代謝に関与していることを示唆しており興味深い。

以上の内容は今後詳細な検討を行い、論文投稿を予定している。

(2) 実験モデルでの Kupffer 細胞の機能

CCl₄ による急性肝障害は実験肝炎も出るとして古くから知られているが、免疫学的な機序、特に Kupffer 細胞が果たす役割については諸説あり、明らかではなかった。CCl₄ をマウス腹腔に投与すると、肝障害と同時に CD11b 陽性の分画が著増し、非常に強く活性化されることを見出した。TNF を始めとする

炎症性サイトカインを分泌し、さらに細胞表面に FasL を表出していた。FasL の発現は抗 TNF 抗体により抑制され、肝障害も軽減した。活性化された CD11b 陽性分画は肝細胞上の Fas 抗原を刺激しアポトーシスを誘導することで、傷害された肝細胞の除去を促進することを見出した。

以上の内容は欧文誌に掲載された(Sato and Nakashima, PLOS One, 2014, e92515)。

免疫細胞は組織の修復に積極的に関与することが知られている。TNF や FasL は通常の細胞に対しては傷害する作用をもつが、再生細胞についてはまったく逆に再生を亢進させる作用を持つ。CD11b 陽性の Kupffer 細胞が組織修復にも関与する可能性を考慮し、マウスに肝切除を実施し肝細胞が再生しつつある状況において、この細胞がどのような機能を発揮するか検討した。肝切除 3 日後、Kupffer 細胞のうち CD11b 陽性の分画が増加する。増加した細胞は細胞内に TNF を含有し細胞表面上に FasL を表出している。これらは実験肝炎の際、肝細胞を傷害する因子であるが、われわれは過去に肝切除後に NKT 細胞が FasL を表出し肝細胞の再生を補助することを報告しており、同様の作用をもつと考えた。次に放射線を照射したのちに肝切除を行ったところ、CD11b 陽性分画の増加は抑制されたが、骨髄移植により回復した。再生肝細胞は放射線照射により減少したが、骨髄移植により回復した。CD11b 陽性の分画は肝臓から分泌されたケモカインである MCP-1 がこの細胞の CCR2 に作用することで骨髄から肝臓に遊走する。そこで CCR2 を抑制するアンタゴニストを投与して肝切除を実施したところ、CD11b 陽性分画の増加は抑制され肝再生は抑制された。以上のことから骨髄由来の CD11b 陽性 Kupffer 細胞は肝臓の再生を促進する作用をもつ。過去報告した NKT 細胞の再生促進作用が切除後 12 時間から 2 日目であるのに対し、CD11b 陽性分画はやや遅く、NKT 細胞からその機能を受け継ぐと考えられた。マクロファージが組織の修復に機能することは非常に興味深い、その主役は肝固有の Kupffer 細胞ではなく骨髄由来で炎症細胞として機能する CD11b 陽性分画であることは興味深い発見であった。

以上の内容は欧文誌に掲載された(Nishiyama and Nakashima, PLOS One, 2015, e136774)。

(3) NASH における Kupffer 細胞の機能

FGF 5 は哺乳類において体毛の長さを決定する因子として知られている。近年、この遺伝子の変異により高血圧を来することが報告され、生活習慣病との関連が注目されている。この遺伝子を欠損したマウスに高脂肪食を摂取させると、肝臓に脂肪化とともに強い炎症所見と繊維化がみられ、ヒトにおける

NASH に酷似した病変をきたす。さらに我々は、このモデルにおいて肝単核球のうち特にマクロファージが異常に増加していることを見出した。増加している細胞群は CD68 と CD11b の両者が陽性であった。この特異なマクロファージは CR1g 遺伝子が陰性であり、貪食能も弱いため CD11b 陽性分画由来であると考えられた。この細胞は炎症性サイトカインである TNF の mRNA の発現が亢進しており、FasL を表出していることから、炎症の起点となり肝細胞を傷害する可能性が高い。また TGF- β を強く発現しており繊維化をきたす主要な要因となる可能性がある。CD11b 陽性分画は骨髄由来であり、放射線に対して強い感受性を持つ特徴がある。そこで高脂肪食を摂取させながら、摂取量を落とさない程度の低用量放射線を照射し続けると、肝障害が軽減することを見出した。肝組織を比較すると放射線照射群は肝細胞の脂肪化は抑制されていないが、炎症性細胞の浸潤と繊維化が消失していた。肝臓から採取される細胞量は減量し、特に特徴的にみられる CD68, CD11b 両者が陽性である分画が消失していた。これらの結果は FGF 5 欠損マウスに高脂肪食を摂取させた際に出現する特異的なマクロファージが、このモデルにおける炎症と繊維化に主要な役割を果たすことを示している。単純性脂肪肝と NASH との違いは炎症と繊維化の出現であるが、その発症メカニズムにおいて移動マクロファージである CD11b 陽性の分画が主要な役割を果たすことを明らかにした。

以上の内容は欧文誌に投稿中である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 6 件)

1. Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Seki S, et al. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *J Leukoc Biol* 2013;94:1325-36.

2. Sato A, Nakashima H, Kinoshita M, Seki S, et al. The effect of synthetic C-reactive protein on the in vitro immune response of human PBMCs stimulated with bacterial reagents. *Inflammation* 2013;36:781-92.

3. Hanaka H, Hamada T, Ito M, Nakashima H, Seki S, et al. Fibroblast growth factor-5 participates in the progression of hepatic fibrosis. *Exp Anim* 2014;63:85-92.

4. Sato A, Nakashima H, Nakashima M,

Kinoshita M, Seki S, et al. Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells/macrophages in CCl4-induced acute hepatic injury. PLoS One 2014;9:e92515.

5. Nishikawa K, Iwaya K, Kinoshita M, Seki S, et al. Resveratrol increases CD68(+) Kupffer cells colocalized with adipose differentiation-related protein and ameliorates high-fat-diet-induced fatty liver in mice. Mol Nutr Food Res 2015;59:1155-70.

6. Nishiyama K, Nakashima H, Ikarashi M, Kinoshita M, Seki S, et al. Mouse CD11b+Kupffer Cells Recruited from Bone Marrow Accelerate Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. PLoS One 2015;10:e0136774.

〔学会発表〕(計 13件)

1. Nakashima H, Kinoshita M, Seki S. Activation of CD11b+ Kupffer cells / macrophages as a common cause for exacerbation of TNF/Fas-ligand-dependent hepatitis in hypercholesterolemic mice. 国際免疫学会 イタリア ミラノ 2013.

2. Kiyoshi N, Nakashima H, Kinoshita M, Seki S et al. CD11b+ Kupffer cells / macrophages accelerate liver regeneration after partial hepatectomy. 日本免疫学会 千葉 2013.

3. Kinoshita M, Nakashima H, Seki S et al. Glucocorticoid receptor-dependent immunomodulatory effect of ursodeoxycholic acid and on liver lymphocytes in mice. 日本免疫学会 千葉 2013.

4. Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Seki S, et al. Distinct development and function of resident and recruited liver Kupffer cells / macrophages. 日本免疫学会 千葉 2013.

5. Nakashima H, Kinoshita M, Seki S. Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells / macrophages in CCl4-induced acute hepatic injury. 米国肝臓学会議 アメリカ ボストン 2014.

6. Nakashima H, Kinoshita M, Seki S. Activated CD11b+ Kupffer cells / macrophages play the pivotal role in diet

induced steatohepatitis in fibroblast growth factor 5 deficient mice. 日本免疫学会 京都 2014.

7. Endo-Umeda K, Nakashima H, Seki S. Liver X receptor modulates innate immune response in hepatic mononuclear cells. 日本免疫学会 京都 2014.

8. Kinoshita M, Nakashima H, Seki S. In vivo endotoxin tolerance alters Kupffer cell phenotype and drastically enhances their bacterial killing. 日本免疫学会 京都 2014.

9. Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Seki S. マウスおよびヒト肝 Kupffer 細胞/マクロファージの表面抗原、発生分化、機能による包括的分類の新規確立 日本肝臓学会 東京 2014.

10. Nakashima H, Kinoshita M, Seki S. Mouse CD11b+ Kupffer cells recruited from bone marrow accelerate liver regeneration after partial hepatectomy. 米国肝臓学会議 アメリカ サンフランシスコ 2015.

11. Nakashima H, Kinoshita M, Seki S. Fibroblast growth factor 5 欠損マウスは高脂肪食により CD11b 陽性 Kupffer 細胞を活性化させ脂肪性肝炎を発症する 日本肝臓学会 熊本 2015.

12. Nakashima N, Kinoshita M, Nakashima H, Seki S. Decreased innate immunity in aged mice and improvement by pioglitazone pretreatment. 日本免疫学会 札幌 2015.

13. Nakashima N, Kinoshita M, Nakashima H, Seki S. 加齢に伴う自然免疫機構の低下とピオグリタゾン投与による増強。 日本細菌学会 大阪 2016.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島弘幸 (NAKASHIMA, Hiroyuki)
防衛医科大学校・その他部局等・助教
研究者番号：10574064

(2)研究分担者

関 修司 (SEKI, Shuhji)
防衛医科大学校・その他部局等・教授
研究者番号：80531392

木下 学 (KINOSHITA, Manabu)
防衛医科大学校・その他部局等・准教授
研究者番号：70531391